

VECTOR FOR PREPARING TRANSFORMED SILKWORM

Patent Number: JP2002306167

Publication

date: 2002-10-22

Inventor(s): YOSHIZATO KATSUTOSHI; TOMITA MASAHIRO; SATO TSUTOMU; MORI HAJIME;
TAMURA TOSHIKI

Applicant(s): JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP;; HIROSHIMA INDUSTRIAL PROMOTION
ORGANIZATION;; TERUMO CORP;; KOKEN CO LTD;; NATIONAL INSTITUTE OF
AGROBIOLOGICAL SCIENCES

Requested

Patent: JP2002306167

Application

Number: JP20000361563 20001128

Priority Number

(s):

IPC

Classification: C12N15/09; A01K67/033; C12N5/10

EC

Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a vector for preparing a transformed silkworm, which has a high gene-transducing efficiency and permits easy injection, and to provide a silkworm transformed with the vector.

SOLUTION: A recombinant AcNPV vector that is a virus vector derived from AcNPV and transfers a foreign gene sandwiched between a pair of inverted repeats of transposon piggyBac to the genomic DNA of a silk worm by the action of the transposase protein of piggyBac and a silk worm transformed with the vector are provided.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-306167

(P2002-306167A)

(43) 公開日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 K 67/033	5 0 1 4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/033	5 0 1	C 1 2 R 1:91	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A
// (C 1 2 N 5/10		5/00	B
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-361563(P2000-361563)

(22) 出願日 平成12年11月28日 (2000. 11. 28)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 596063056

財団法人 ひろしま産業振興機構

広島県広島市中区千田町3丁目7-47

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換カイコ作製用ベクター

(57) 【要約】

【課題】 高い遺伝子導入効率と注入の容易さを兼ね備えたカイコ形質転換用ベクター、およびこのベクターによる形質転換カイコを提供する。

【解決手段】 AcNPV由来のウイルスベクターであって、トランスポゾンpiggyBacの一对の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子を、piggyBacのトランスポゼースタンパク質の作用によってカイコのゲノムDNAに転移させる組換えAcNPVベクターと、このベクターによる形質転換カイコ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Autographa californica*核多角体病ウイルス（AcNPV）のゲノムDNA内に、トランスポゾンpiggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれたトランスポゼース遺伝子とからなるDNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター。

【請求項2】 AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれた外来遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター。

【請求項3】 AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacのトランスポゼース遺伝子DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター。

【請求項4】 AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子DNAと反復配列で挟まれた領域の外側のトランスポゼース遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター。

【請求項5】 請求項1の組換えAcNPVベクターを感染させたカイコおよびその子孫であって、piggyBacのトランスポゼース遺伝子をゲノムDNA中に保有し、トランスポゼースタンパク質産生能を有する形質転換カイコ。

【請求項6】 請求項5の形質転換カイコに、請求項2の組換えAcNPVベクターを感染させたカイコであって、請求項2の組換えAcNPVベクターの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

【請求項7】 請求項2の組換えAcNPVベクターと、請求項3の組換えAcNPVベクターを同時に感染させたカイコであって、請求項2の組換えAcNPVベクターの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

【請求項8】 請求項4の組換えAcNPVベクターを感染させたカイコであって、請求項4の組換えAcNPVベクターの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、形質転換カイコを作製するためのベクターおよび形質転換カイコに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、カイコの品種改良や、カイコによる有用タンパク質の大量生産に使用可能な組換えAcNPVベクターと、このベクターによる形質転換カイコに関するものである。

【0002】

【従来の技術】マウス、ウシ、ブタなどの哺乳動物およびショウジョウバエなどの無脊椎動物では、生物個体に外来遺伝子を導入して形質転換動物を作製する技術が確立している。この形質転換動物作製技術は、未知遺伝子の機能を解析するための手段として生命科学の基礎研究

分野で利用されているほか、家畜動物の品種改良や、医薬品成分等としての有用タンパク質を生産する動物を作製するために用いられるなど、様々な産業分野で利用されている。

【0003】カイコは絹糸を生産するための家畜昆虫であることに加え、生理・生化学、遺伝学などの基礎研究分野で実験動物として使用されている。さらに、優れたタンパク質合成能力を有することから有用タンパク質を生産するための宿主動物としても大きく期待されている。そこで、カイコに外来遺伝子を導入し形質転換カイコを作製する技術を開発することが望まれている。

【0004】カイコにおける一過性の外来遺伝子発現システムとしては、カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）をベクターとして利用する方法が確立されている（特公平7-97995）。しかし、この方法ではウイルスの感染によりカイコが致死するため、次世代以降に外来遺伝子を伝達することができず、有用タンパク質の発現は一代限りである。そのため、外来遺伝子を発現させる度にウイルス接種を行う必要がある。一方、森らは*Autographa californica*核多角体病ウイルス（AcNPV）をカイコ幼虫に感染させることにより、カイコを致死させることなく遺伝子を導入し、メスに感染させた場合には生殖細胞を通じて次世代まで外来遺伝子を伝達することが可能な方法を開発した（特開平6-277051）。さらに、山尾らはフィブロインL鎖遺伝子配列の一部を組み込んだAcNPVを構築し、これをカイコ幼虫に感染させ、遺伝子ターゲティングにより外来遺伝子をカイコゲノムのフィブロインL鎖遺伝子に挿入した形質転換カイコを作製することに成功している（Genes Dev. 13, 511-516, 1999）。また、田村ら（Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000）は、鱗翅目昆虫*Trichoplusia ni*に由来するトランスポゾンであるpiggyBacを組み込んだプラスミドベクターをカイコ卵に微量注射することにより、外来遺伝子を挿入した形質転換カイコを作製することに成功している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、世代を通じて外来遺伝子を伝達することができる形質転換カイコを作製する方法として、AcNPVをベクターとして外来遺伝子を遺伝子ターゲティング法により導入する方法と、piggyBacを組み込んだプラスミドベクターをカイコ卵に微量注入することにより外来遺伝子を導入する方法の2つが開発されている。

【0006】AcNPVを用いる方法は、ウイルスをカイコ幼虫に接種するためベクターの注入が容易であるという利点がある。しかしながら、ゲノムへの遺伝子組み込みは、組換え確率の極めて低い相同組換えに頼らなければならないため、遺伝子導入効率を上げることが難しいという欠点をもつ。

【0007】またpiggyBacを組み込んだプラスミドベクターを用いる方法は、piggyBacの遺伝子転移作用を利用

するため遺伝子導入効率が高いという利点がある一方で、カイコ卵にプラスミドを微量注入することが技術的に容易ではないという欠点を有する。

【0008】この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、高い遺伝子導入効率と注入の容易さを兼ね備えた、形質転換カイコ作製のベクターと、このベクターによる形質転換カイコを提供することを課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】この出願は、前記の課題を解決するため、以下の(1)～(8)の発明を提供する。

(1) AcNPVのゲノムDNA内に、トランスポゾンpiggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれたトランスポゼース遺伝子とからなるDNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター（以下、「ベクターA」と記載する）。

(2) AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれた外来遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター（以下「ベクターB」と記載する）。

(3) AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacのトランスポゼース遺伝子DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター（以下、「ベクターC」と記載する）。

(4) AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子DNAと反復配列に挟まれた領域の外側のトランスポゼース遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている組換えAcNPVベクター（以下、「ベクターD」と記載する）。

(5) 前記発明(1)のベクターAを感染させたカイコおよびその子孫であって、piggyBacのトランスポゼース遺伝子をゲノムDNA中に保有し、トランスポゼースタンパク質産生能を有する形質転換カイコ。

(6) 前記発明(5)の形質転換カイコに、前記発明(2)のベクターBを感染させたカイコであって、ベクターBの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

(7) 前記発明(2)のベクターBと、前記発明(3)のベクターCを同時に感染させたカイコであって、ベクターBの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

(8) 前記発明(4)のベクターDを感染させたカイコであって、ベクターDの外来遺伝子をゲノムDNA中に保有し、この外来遺伝子産物産生能を有する形質転換カイコ。

【0010】

【発明の実施の形態】トランスポゾンpiggyBacは、鱗翅目昆虫Trichoplusia ni由来の培養細胞であるTN-368から単離されたClass IIに属するトランスポゾンである。中央部にあるトランスポゼース遺伝子と、その両端に存在する13 bpの逆向き反復配列から構成されており、長さは約2.5 kbである。トランスポゼース遺伝子からはト

ランスポゼースタンパク質が合成され、この酵素の作用により、逆向き反復配列にはさまれた領域（piggyBac自体）を標的配列であるTTAAに転移させる。

【0011】この出願の発明は、AcNPVを利用して外来遺伝子をカイコに導入するとともに、piggyBacの転移活性を利用して外来遺伝子をカイコのゲノムDNAに安定かつ高効率で組換えることを可能とするものであり、以下の4種類の組換えAcNPVベクターを提供する。

ベクターA：AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれたトランスポゼース遺伝子とからなるDNA断片が組み込まれている。

ベクターB：AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列とそれらに挟まれた外来遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている。

ベクターC：AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacのトランスポゼース遺伝子DNA断片が組み込まれている。

ベクターD：AcNPVのゲノムDNA内に、piggyBacの一对の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子DNAと反復配列の外側のトランスポゼース遺伝子DNAとからなる融合DNA断片が組み込まれている。

【0012】これらの組換えAcNPVベクターA～Dは、例えば、AcNPVのゲノムDNA配列の一部を保有するプラスミド（トランスファーベクター）に、それぞれ必要な配列を組み込み、このトランスファーベクターをAcNPV DNAと共にSf9細胞等の培養昆虫細胞にトランスフェクションすることにより作製することができる。

【0013】ベクターAの作製において、トランスファーベクターに組み込むpiggyBacは、公知のプラスミドクローンp3E1.2（Virology 172, 156-169, 1989）から切り出して使用することができる。

【0014】ベクターBおよびDの作製においては、前記クローンからそれぞれの反復配列を切り出し、外来遺伝子の両側にそれらの反復配列を逆向きに接続することによって融合DNA断片を作製し、このDNA断片をトランスファーベクターに組み込むようにする。あるいは、前記クローンのトランスポゼース遺伝子領域に外来遺伝子を組み込むか、あるいはトランスポゼース遺伝子領域を外来遺伝子DNAによって置換し、この組換えクローンから融合DNA断片を切り出し、これをトランスファーベクターに挿入するようにしてもよい。なお、外来遺伝子DNAには特段の制限はなく、カイコの品種改良や、あるいはカイコでの産生を目的とするタンパク質の遺伝子cDNA等を適宜に使用することができる。

【0015】ベクターCおよびDの作製において、piggyBacのトランスポゼース遺伝子DNAは前記クローンから切り出して使用することができる。その場合、トランスポゼース遺伝子領域のみを切り出して使用してもよく、あるいは一方の反復配列を含んだ状態で切り出してよい。また、ベクターD作製のトランスファーベクターは、このトランスポゼース遺伝子DNAを、ベクターB作製のため

のトランスファーベクターに挿入結合することによって作製することができる。あるいは、一対の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子DNAとトランスポゼース遺伝子DNAとの融合DNA断片を作製し、このDNA断片をトランスファーベクターに挿入するようにしてもよい。

【0016】なお、トランスポゼース遺伝子および/または外来遺伝子の発現を制御するプロモーター/エンハンサーは、それぞれの遺伝子の内在性プロモーター/エンハンサーをそのまま使用しても良いし、あるいは内在性プロモーターを外来性のプロモーターと置換したり、内在性プロモーターの上流に外来性エンハンサーを組み込んでも良い。置換するプロモーターとしては、例えばカイコアクチンプロモーターや、ショウジョウバエHSP70プロモーター等を挙げることができる。

【0017】以上のとおりの組換えAcNPVベクターA~Dを用いることによって、以下の3種類の形質転換カイコが作製される。

(i) ベクターAを感染させた形質転換カイコ (piggyBacのトランスポゼースタンパク質を合成するカイコ) またはその子孫に、ベクターBを感染させた形質転換カイコおよびその子孫。ベクターBの外来遺伝子が、カイコが合成するトランスポゼースタンパク質によってカイコ・ゲノムDNAに転移し、外来遺伝子を発現する。

(ii) ベクターBとベクターCを同時に感染させた形質転換カイコおよびその子孫。ベクターBの外来遺伝子が、ベクターCの発現するトランスポゼースタンパク質によってカイコ・ゲノムDNAに転移し、外来遺伝子を発現する。

(iii) ベクターDを感染させた形質転換カイコおよびその子孫。ベクターDが発現するトランスポゼースタンパク質によって、ベクターDの外来遺伝子がカイコ・ゲノムDNAに転移し、外来遺伝子を発現する。

【0018】これらの形質転換カイコにおいては、一対の逆向き反復配列に挟まれた外来遺伝子DNAは、トランスポゼースタンパク質の作用によってカイコ・ゲノムの標的配列TTAAに転移される。ただしトランスポゼース遺伝子は、(i)の場合はカイコ・ゲノムDNA内、(ii)の場合は外来遺伝子を組み込んだベクターBとは別のベクターC、(iii)の場合には、外来遺伝子を組み込んだ一対の逆向き反復配列の外側で、それぞれ発現している。これによって、トランスポゼース遺伝子を外来遺伝子と共にカイコ・ゲノム内に転移させることによる外来遺伝子のゲノム内での不安定化が防止され、外来遺伝子がカイコ・ゲノム内で安定に発現する。

【0019】組換えAcNPVベクターのカイコへの接種・感染および次世代以降のカイコのスクリーニングは山尾らの方法 (Genes Dev. 13, 511-516 (1999)) に準じて行うことができる。例えば、5齢メス幼虫に組換えAcNPVベクターの1種または2種を接種し、羽化後に正常オスと交配させ産卵させる。得られたF1世代のカイコから

外来遺伝子が組み込まれている陽性個体をスクリーニングし、正常個体と交配し産卵させる。そしてさらに得られたF2集団から陽性個体をスクリーニングする。スクリーニングには例えば、卵や幼虫体液からゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としたPCR反応により外来遺伝子を検出する方法などを行うことができる。また、外来遺伝子とともにマーカー遺伝子を同時にベクター内に組み込むこともでき、この場合にはマーカー遺伝子の表現型を指標としてスクリーニングすることも可能である。例えば、GFPを含む蛍光タンパク質遺伝子をマーカー遺伝子として組み込んだ場合には、卵や幼虫に励起光をあててその蛍光を観察することなどの方法によってスクリーニングすることもできる。

【0020】以下、実施例を示して、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0021】

【実施例】実施例1：piggyBacを組み込んだAcNPVの作製

piggyBac遺伝子を含んだプラスミド (p3E1.2) より、piggyBac遺伝子を制限酵素BamHIおよびHindIIIで切り出し、バキュロウイルストランスファーベクターpBlueBacHisC (Invitrogen) のBamHIおよびHindIII切断部位に挿入した。得られたトランスファーベクターを線状バキュロウイルスDNA (Pharminogen) とともにリポフェクション (Gibco) を用いて、ヨトウガ由来培養細胞 (Sf9) にトランスフェクションした。次に培養上清中に生成されたpiggyBacを含む組換えウイルスをブランク法で純化し、さらにこのウイルスをSf9細胞に感染させることにより、高力価のウイルス溶液を調製した。

実施例2：ウイルス接種およびpiggyBacの世代間での検出

カイコ5齢1日目幼虫に50 μ lのウイルス液 (5 $\times 10^6$ pfu) を皮下注射した。ウイルス接種した幼虫が蛹化した後、20 μ gの20-hydroxyecdysoneを投与して蛹の発育を促進させた。次に羽化したカイコガを正常カイコガと交配させ、産卵させた。1頭のカイコガが生んだF1卵 (100~300粒) を1グループとし、各グループから約50粒の卵をサンプリングし、残りの卵については飼育を続けた。サンプリングした卵から定法によりDNAを抽出し、PCR法によりpiggyBac遺伝子の有無を判定した。PCRはプライマー (配列番号1および2の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド) を用いてpiggyBac遺伝子断片を増幅するように行い、増幅産物はアガロースゲル電気泳動により検出した。6回の実験を行い、合計215グループの卵をスクリーニングした結果、31グループが陽性であった (14.4%) (表1)。次にこれら陽性グループの残りの卵を孵化させ、孵化したF1幼虫を5齢まで飼育した。5齢3日目に各幼虫より約100 μ lの体液を採取し、これらの体液から遠心操作により体液細胞を分離し、DNAを抽出した

後、前記と同様のPCR法によりスクリーニングを行った。合計821頭の5齢幼虫をスクリーニングした結果、33頭が陽性であった(4.0%) (表1)。これらの陽性カイコについてはその飼育を続け、羽化したカイコガを正常カイコガと交配させ産卵させた。F2世代のカイコもF1世代同様のスクリーニングを行った。即ち、卵の一部から抽出したDNAを鋳型にして同様にPCRを行い、陽性卵グ

ループの残りの卵を飼育し、得られた5齢幼虫の全てから体液を採取しPCRによる判定を行った。その結果、F2卵では26.3%、F25齢では1.7%の陽性率であった(表1)。

【0022】

【表1】

実験 No.	F0 接卵数	F1 卵 PCR+/全数(%)	F1 5齢 PCR+/全数(%)	F2 卵 PCR+/全数(%)	F2 5齢 PCR+/全数(%)	F3 卵 PCR+/全数(%)	F3 5齢 PCR+/全数(%)
1	90	3/22 (13.6%)	2/58 (3.4%)	1/1 (100%)	0/3	—	—
2	90	4/51 (7.9%)	21/117 (17.9%)	3/11 (27.3%)	1/20 (5.0%)	—	—
					0/3	—	—
					1/74 (1.4%)	1/1 (100%)	2/34 (5.9%)
3	90	1/35 (2.9%)	5/161 (3.1%)	1/7 (14.3%)	0/20	—	—
4	90	1/43 (2.3%)	—	—	—	—	—
5	60	11/26 (42.3%)	1/81 (1.2%)	—	—	—	—
			1/133 (0.8%)	—	—	—	—
6	60	11/38 (28.9%)	1/85 (1.2%)	—	—	—	—
			2/186 (1.1%)	—	—	—	—
計	480	31/215 (14.4%)	33/821 (4.0%)	5/19 (26.3%)	2/120 (1.7%)	—	—

【0023】実施例3：インバースPCR法によるpiggyBac挿入の確認

上記の陽性F2カイコのうち3頭から定法によりゲノムDNAを抽出した。得られたDNAのうち3μgを制限酵素SauIII AIで消化し、次にT4DNA リガーゼを用いてDNA断片を環状化した。この環状化DNAを鋳型としてPCRを行うことにより、piggyBac挿入位置周辺のDNA配列をinversed PCRで増幅し、さらにシークエンスを行い挿入位置を決定した。このinversed PCRに用いたプライマーは、piggyBacの5'側挿入配列を増幅するためのものとして配列番号3および4のオリゴヌクレオチドを、3'側挿入配列を増幅するためのものとして配列番号5および6の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。シークエンスにより決定した挿入位置の塩基配列を図1 (a)~(c) に示した。3個体とも、piggyBacはTTAA配列ではさまれ

るように挿入されていた。これは、トランスポゼースがTTAA配列を認識して、piggyBacをこの位置に転移させたことを示している。

【0024】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、高い遺伝子導入効率と注入の容易さを兼ね備えたカイコ形質転換用ベクター、およびこのベクターによる形質転換カイコが提供される。この発明により、形質転換によるカイコの品種改良や、有用タンパク質を大量に生産する形質転換カイコの作製がより容易に行えるようになり、幅広い分野でのカイコの有効利用が可能となる。

【0025】

【配列表】

<110>: Japan Science and Technology Corporation et al.
 <120>: A vector for transforming a silk worm
 <130>: NP00532-YS
 <160>:
 <210>: 1
 <211>: 20
 <212>: DNA
 <213>: Artificial sequence
 <220>:
 <213>: Synthesized oligonucleotide
 <400>: 1
 AAACAAACGC GAGATACCGG

<;210>; 2
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;213>; Synthesized oligonucleotide
 <;400>; 2
 CACGATGCAT TTGCCTTTCC 20
 <;210>; 3
 <;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;213>; Synthesized oligonucleotide
 <;400>; 3
 ATCAGTGACA CTTACCGCAT TGACA 25

<;210>; 4
 <;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;213>; Synthesized oligonucleotide
 <;400>; 4
 TGACGAGCTT GTTGGTGAGG ATTCT 25
 <;210>; 5
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;213>; Synthesized oligonucleotide
 <;400>; 5
 TACGCATGAT TATCTTTAAC GTA 23
 <;210>; 6
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;213>; Synthesized oligonucleotide
 <;400>; 6
 GGGGTCCGTC AAAACAAAAC ATC 23

【図面の簡単な説明】

ac挿入位置の塩基配列である。

【図1】形質転換カイコ3頭のゲノムDNAにおけるpiggyB

【図1】

(a)

ttcacttgcgttaacgccttcagtttaattTAA—piggyBac—TTAAaaattataaaactcaatgactcg

(b)

actggtagtcgcggcgaaatagtcagtgatTAA—piggyBac—TTAAatgagtttagtttttcgccgcg

(c)

ccaataataggtcctgaacraaaaaactaTAA—piggyBac—TTAAtttgtaagcaatcagagataatt

フロントページの続き

(71)出願人 591071104

株式会社高研

東京都豊島区目白3丁目14番3号

(71)出願人 501167644

独立行政法人農業生物資源研究所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 吉里 勝利

広島県東広島市八本松南7-22-13

(72)発明者 富田 正浩

広島県東広島市西条中央5-1-19

(72)発明者 佐藤 勉

広島県東広島市西条中央7-21-36

(72)発明者 森 肇

京都府京都市北区小山下内河原町27-1

(72)発明者 田村 俊樹

茨城県つくば市大わし1-2 農林水産省

蚕糸・昆虫農業技術研究所内

Fターム(参考) 4B024 BA10 BA80 CA01 CA02 CA20

DA02 EA02 EA04 GA12 GA13

HA11

4B065 AA90X AA95X AA99Y AB01

AC14 BC01 BC50 BD50 CA27

CA60